

Prolongamento da vida útil do Queijo Fresco

Catarina Baptista Proença Braz

Dissertação para obtenção de Grau Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: António Pedro Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Isabel Nunes Januário, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor António Pedro Louro Martins, Professor Auxiliar Convidado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientador

Agradecimentos

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas. Na realização desta dissertação de mestrado contei com importantes apoios e incentivos, sem os quais não se teria tornado uma realidade, e aos quais estarei eternamente grata.

Em primeiro lugar à minha família, especialmente aos avós, pais e irmãos pelo amor incondicional, pelo apoio, paciência e carinho inestimáveis, pelos diversos sacrifícios suportados e pela formação que me deram.

À empresa Braz & Irmão, onde realizei o meu estágio, pela oportunidade de realização do estágio, e pelo acolhimento e disponibilização de todos os recursos necessários para a realização deste estágio.

Ao Professor Pedro Louro Martins, pela sua orientação, apoio, disponibilidade, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, e total colaboração no solucionar de dúvidas ao longo da realização desta dissertação.

À Engenheira Fernanda Bento, pela disponibilidade, apoio, interesse demonstrado e conhecimentos transmitidos, imprescindíveis para este trabalho.

A todos os colaboradores da empresa por toda a simpatia, apoio, carinho e ensinamentos prestados ao longo do estágio.

Ao Instituto Superior de Agronomia, por todas as oportunidades proporcionadas ao longo do curso, e a todos os professores pelos conhecimentos transmitidos ao longo destes anos, que contribuíram para a minha formação em Engenharia Alimentar.

Aos meus amigos, em especial ao João Carvalho, e ao meu namorado José Carneira, que estiveram ao meu lado durante esta fase, pelo apoio, pela ajuda, pela força e pela amizade.

A todos eles, dedico todo este trabalho.

Muito Obrigado!

Resumo

O queijo fresco é um produto que relativamente a outros produtos lácteos é muito perecível mas com a contrapartida de ser um dos produtos lácteos mais procurados e portanto um dos que apresenta, sob o ponto de vista comercial, maior saída na maioria das indústrias.

Com o intuito de aumentar a vida útil deste queijo de leite de vaca pasteurizado, realizou-se um estudo das alternativas como é o caso dos conservantes, atmosferas modificadas e embalagem e optou-se por averiguar as potencialidades de um produto à base de bacteriocinas denominado Protective.

De forma a estudar o possível efeito de Protective em queijo fresco testou-se a sua adição no leite e na coalhada e numa segunda fase a melhor concentração no modo de adição mais eficaz, sendo a avaliação efetuada com base em análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais no queijo fresco ao fim de 2, 6 e 10 dias de conservação.

Verificou-se que o Protective é mais eficiente quando adicionado ao leite, uma vez que é a forma de adição que confere ao queijo fresco melhores resultados microbiológicos e sensoriais. Na segunda fase de estudo verificou-se que a concentração que apresentou melhores resultados foi a DR25 (concentração 25% superior à dose recomendada) e que concentrações de Protective pelo menos iguais ou superiores a DR50 (concentração 50% superior à dose recomendada) deixam de ser vantajosas a nível microbiológico.

Palavras-chave: queijo fresco; vida útil; bacteriocinas; Protective.

Abstract

Portuguese fresh white cheese type is a very perishable product when compared to other cheeses or dairy products. However, it is one of the most popular dairy product and therefore one of the most commercially interesting products for most industries.

In order to increase the shelf-life of this pasteurized cow's milk cheese, an evaluation of alternatives such as preservatives, modified atmospheres and packaging was carried out and it was decided to investigate the potentialities of a commercial bacteriocin-based product, named Protective.

The In order to study the possible effect of Protective on fresh cheeses its addition to milk or to curd was first tested. In a second step, the best concentration for the most efficient addition mode was tested; in these two phases physical-chemical, microbiological and sensorial properties were evaluated in fresh cheese after 2, 6 and 10 days of refrigerated storage.

It was concluded that Protective is more efficient when added to milk, since it is the form of addition that gives fresh cheese better microbiological and sensorial results. In the second phase of the study it was found that the concentration of DR25 presented the best results and that Protective concentrations at least equal to or greater than DR50 was no longer advantageous at the microbiological level.

Keywords: fresh cheese; shelf life; bacteriocins; Protective.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice de tabelas.....	vi
Índice de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas	viii
1.Introdução e Objetivos	1
2. Enquadramento Teórico	2
2.1. Queijo Fresco	2
Importância Económica.....	2
2.1.2. Apresentação da empresa “Braz&Irmão, LDA”	6
2.1.3. Caracterização	8
2.1.4. Tecnologia de fabrico	9
2.2. Vida útil: Durabilidade/ limite de consumo	10
2.3. Fatores que afetam a data limite de consumo nos queijos frescos	12
2.3.1. Possibilidades de aumento da data limite de consumo de queijo fresco.....	12
2.3.2. Conservantes	13
2.3.3. Atmosferas modificadas	13
2.3.4. Embalagem	14
2.3.5. Altas Pressões Hidrostáticas.....	15
2.3.6. Óleos Essenciais/ Compostos Fenólicos.....	15
2.3.7. Biopreservação: Bacteriocinas / Culturas que produzem bacteriocinas.....	16
3- Materiais e Métodos.....	19
3.1 Plano Experimental	19
3.2 Materiais	19
3.2.1 Leite	19
3.2.2. Bacteriocinas de bactérias lácteas –Protective.....	20
3.3. Métodos	20

3.3.1. Ensaios preliminares	20
3.3.2. Ensaios de concentração de Protective.....	20
3.3.3. Métodos Analíticos	21
3.3.4. Análise sensorial	22
3.3.5. Análise de resultados	22
4.Resultados e Discussão.....	24
4.1. Estudo do momento de aplicação do produto.....	24
4.1.1 Caracterização do leite.....	24
4.1.2. Caracterização do queijo.....	25
4.1.2.1. Caracterização físico-química e microbiológica.....	25
4.1.2.2.Análise sensorial	29
4.2. Estudo da dose de adição	30
4.2.1 Caracterização do leite (2ª fase de estudo)	30
4.2.2 Caracterização do queijo.....	30
5. Conclusões	36
6. Referências Bibliográficas.....	37
7. ANEXOS	40
7.1. Anexo I – Ficha Técnica de Protective	40
7.2. Anexo II – Análise sensorial	43
7.3. Anexo III – Resultados Análise Sensorial no 2º dia	44
7.4. Anexo IV – Resultados Análise sensorial no 6º dia	45
7.5. Anexo V – Resultados Análise sensorial no 2º e 6º dias	46

Índice de tabelas

Tabela 1 - Recolha de leite de vaca e produtos lácteos obtidos.....	3
Tabela 2 - Resultados da análise ao leite cru no dia 04 de Abril de 2017	24
Tabela 3 - Análises ao leite cru no dia 12 de Julho de 2017	24
Tabela 4 - Resultados da análise de variância efetuada relativamente às características do queijo (1ª fase).....	25
Tabela 5 - Resultados médios dos parâmetros pH, Resíduo seco e Atividade da água em função das modalidades de adição do Protective e do tempo de conservação.....	25
Tabela 6 - Resultados médios dos parâmetros microbiológicos (log ₁₀ ufc/g) em função das modalidades de adição de Protective e do tempo de conservação.	26
Tabela 7 - Resultados da análise de variância efetuada relativamente à avaliação sensorial do queijo (1ª fase).....	29
Tabela 8 - Resultados médios dos parâmetros sensoriais em função das modalidades de adição de Protective e do tempo de conservação	30
Tabela 9 - Resultados médios dos parâmetros microbiológicos (log ₁₀ ufc/g) em função das modalidades de adição de Protective e do tempo de conservação.	31
Tabela 10 - Resultados médios de pH, RS e Atividade da água efetuados dos queijos frescos (2ª fase).....	31
Tabela 11 - Resultados médios dos parâmetros pH, Resíduo seco e Atividade da água em função das modalidades de concentração de Protective e do tempo de conservação.	32
Tabela 12 - Resultados da análise de variância efetuada relativamente à análise sensorial do queijo (2ª fase).....	34
Tabela 13 - Resultados médios dos parâmetros sensoriais em função das modalidades de concentração de Protective e do tempo de conservação	34
Tabela 14 - Resultados de Análise Sensorial ao 2º dia do 1º fabrico (06/04/2017)	44
Tabela 15 - Resultados de Análise sensorial no 2º dia do 2º fabrico (07/04/2017).....	44
Tabela 16 - Resultados de Análise Sensorial ao 6º dia do 1º fabrico (11/04/2017)	45
Tabela 17 - Resultados de Análise Sensorial ao 6º dia do 2º fabrico (12/04/2017)	45
Tabela 18 - - Resultados de Análise Sensorial ao 2º dia (13/07/2017).....	46
Tabela 19 - Resultados de Análise Sensorial ao 6º dia (17/07/2017).....	46

Índice de Figuras

Figura 1 - Produção de Queijo entre 2011 e 2016. Fonte: (Instituto Nacional de Estatística I. , Estatísticas Agrícolas 2016, 2017) (Instituto Nacional de Estatística I. , Estatísticas Agrícolas 2013, 2014).....	3
Figura 2 - Destino do leite usado na União Europeia	4
Figura 3 - Consumo de queijo nos EU 28 entre 2010 e 2012.....	6
Figura 4 - Queijaria Braz & Irmão,LDA.....	8
Figura 5 - Queijo fresco da empresa Braz&Irmão, LDA	8
Figura 6 Fluxograma do queijo fresco.....	9
Figura 7 - Gráfico de contagem de mesófilos totais a 30°C (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado à coalhada.....	27
Figura 8 - Gráfico de contagem de psicotróficos (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado à coalhada	28
Figura 9 - Gráfico de contagem de coliformes (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado à coalhada	28
Figura 10 - Gráfico de contagem de mesófilos totais a 30°C (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, DR0, DR25 e DR50 em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado ao leite	33
Figura 11 - Gráfico de contagem de Psicotróficos (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, DR0, DR25 e DR50 em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado ao leite.....	33
Figura 12 - Gráfico de contagem de Coliformes Totais (ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, DR0, DR25 e DR50 em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado ao leite.....	33

Lista de Abreviaturas

ufc – Unidade formadora de colónia

RS – Resíduo Seco

DR0 – Dose recomendada de Protective

DR25 – Concentração 25% superior à dose recomendada

DR50 – Concentração 50% superior à dose recomendada

1. Introdução e Objetivos

O queijo fresco tradicional, de teor elevado em humidade e baixo teor em sal, consequentemente um produto de durabilidade curta, é um dos produtos lácteos transformados mais procurados pelo mercado e, portanto, um dos que apresenta mais saída na maioria das indústrias.

O tema deste trabalho surgiu a partir do reconhecimento desta relevância, para a qual uma importante questão ou limitação se refere exatamente ao seu curto período de validade.

Para aumentar o período de validade para consumo, o que facilita todo o processo de preparação e expedição das encomendas e a duração tanto nos postos de venda como na casa dos consumidores, existem diversas possibilidades, como a diminuição do teor em humidade, por exemplo através de prensagem mais intensa do queijo, ou a aplicação de conservantes, entre outras. Neste caso, procurou-se aplicar um produto conservante, de uma nova geração, de um grupo que começa a estar presente no mercado, e que fosse eficaz relativamente ao objetivo de prolongar a durabilidade do produto, mantendo ou mesmo melhorando as características do queijo que se faz habitualmente. Com a aplicação de bacteriocinas, pretende-se procurar uma ação de controlo da componente microbiana que contamina o queijo e que é responsável pela degradação das suas características, designadamente da transformação mais comum neste tipo de produtos frescos, a acidificação do queijo.

Este estudo efetuou-se com queijo fresco de leite de vaca pasteurizado produzido na queijaria Braz & Irmão, LDA., localizada na região da Beira Baixa, a qual produz vários produtos de entre os quais o queijo fresco de leite de vaca pasteurizado o qual foi o objeto de estudo. O trabalho consistiu em estudar a forma de adição e a concentração mais eficazes para tal. Após 2, 6 e 10 dias de conservação, após o fabrico, procedeu-se a análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, cujos resultados foram tratados estatisticamente de forma a avaliar o efeito dos diferentes tratamentos utilizados quer no que se refere ao modo de utilização do produto, quer relativamente à dosagem de aplicação mais eficiente.

2. Enquadramento Teórico

2.1. Queijo Fresco

Importância Económica

Segundo o INE, a produção de leite de vaca tem vindo a diminuir nos últimos anos, tendo, apesar de algumas pequenas flutuações, afluído a quota de produção de leite definida para Portugal pela EU. Apresentou uma descida entre 2011 e 2013 e aumentou em 2014 e 2015, anos em que o regime de quotas se extinguiu, voltando a diminuir em 2016 em que houve uma diminuição de -4,5%. A descida da produção de leite de vaca em 2016 deveu-se a vários fatores podendo salientar-se o que decorre da extinção do regime de quotas e medidas tomadas desde então, designadamente a introdução/alteração de contratos entre os compradores e os vendedores de leite. Estes contemplavam volumes de leite bastante inferiores aos de 2015, incluindo ainda parâmetros mensais do leite que, caso não fossem cumpridos, dariam lugar a sanções monetárias. Esta diminuição teve, assim, origem em vários fatores: desequilíbrio entre a oferta e a procura de produtos lácteos, apoio comunitários para a redução da produção de leite (só este apoio levou a uma quebra de 16 mil toneladas de leite), diminuição do consumo de leite líquido, o embargo russo a importações da União Europeia, entre outros (Instituto Nacional de Estatística I. P., 2015) (Instituto Nacional de Estatística I. , Estatísticas Agrícolas 2015, 2016) (Instituto Nacional de Estatística I. , 2017)

Mas a mesma tendência não se verificou na produção de queijo de vaca. Esta também diminuiu entre 2011 e 2013, todavia verificou-se um aumento em 2014 e em 2016 (com 61 mil toneladas, aumento de 5,4%), apesar de em 2015 ter havido uma quebra (Figura 1).

Como é possível verificar na seguinte Tabela 1, em 2014, o aumento de produção de leite de vaca, não correspondeu a um aumento geral e homogéneo de todos os seus derivados, tendo-se verificado um aumento na produção de natas para consumo, leite em pó magro, manteiga e queijo de vaca, e uma diminuição nos outros derivados (leite para consumo público, leite em pó gordo e meio gordo e iogurtes e outros leites acidificados), havendo sempre que considerar que o grau de autoaprovisionamento é diferente em função dos grupos de produtos que as estatísticas consideram. Apesar das variações terem sido desiguais, não foram suficientemente significativas para provocarem alteração nos principais produtos lácteos obtidos (os 3 principais, continuaram a ser os 3 mais significativos) (Instituto Nacional de Estatística I. P., 2015).

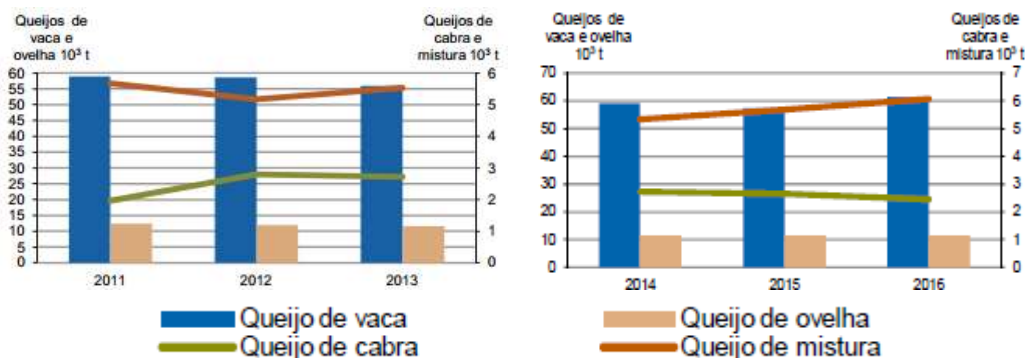


Figura 1 - Produção de Queijo entre 2011 e 2016. Fonte: (Instituto Nacional de Estatística I. , Estatísticas Agrícolas 2016, 2017) (Instituto Nacional de Estatística I. , Estatísticas Agrícolas 2013, 2014)

Tabela 1 - Recolha de leite de vaca e produtos lácteos obtidos

Portugal		Unidade: t		
Produtos	Anos	2013	2014	2015 Po
Recolha				
Leite de vaca		1 777 092	1 924 129	1 935 177
Produtos lácteos obtidos				
Leite para consumo público		834 470	831 530	747 596
Nata para consumo		18 763	19 836	20 237
Leite em pó gordo e meio gordo		8 441	8 008	8 251
Leite em pó magro		6 199	11 818	18 926
Manteiga		25 736	28 114	32 285
Queijo de vaca		55 972	59 042	57 339
Iogurtes e outros leites acidificados		122 752	114 791	108 221

No quinquénio 2010-2015, a análise das variações médias anuais dos produtos lácteos e das suas valorizações foram díspares consoante o produto em causa. Enquanto o leite para consumo apresentou valores apenas negativos (-2,1% em volume e -3,6% em vendas), a nata apresentou valores positivos (+2,3% em volume e -7,7% em vendas). Neste mesmo período, todos os produtos transformados apresentaram valores positivos de taxa média de variação anual, apresentando o queijo valores de +1,8% em volume e um aumento de 3,8% em vendas e sendo este o lacticínio mais valorizado (INE, 2015), o que significa que, embora de forma ligeira, o desvio do leite para a produção de produtos transformados e, em particular, do queijo, tem sido uma realidade.

Este comportamento do sector, em Portugal, não se diferencia muito, em tendência, do que se verificou na UE. Relativamente à produção de lacticínios a nível

da união europeia (UE 28), no quinquénio (2010-2015), o comportamento foi semelhante ao ocorrido em Portugal. Quanto à variação média anual em volume, a nata e os iogurtes apresentaram valores negativos, -7,9% e -3,4% respetivamente. Ao contrário da nata e dos iogurtes, os principais produtos lácteos transformados apresentaram valores de variações médias anuais (em volume) positivas e mais significativas, sendo que o leite em pó apresentou um valor de +45,7%, a manteiga de +29,9% e o queijo de +16,6%. Relativamente à taxa média de variação anual em vendas, os lacticínios apresentaram todos valores positivos, sendo que o queijo apresentou um aumento de 21,2%; o lacticínio que menor valor apresentou foi o iogurte, com um aumento de apenas 0,8% (INE, 2015). Também é de salientar que o queijo é o principal destino do leite na europa (Figura 2) sendo utilizado 36% do leite da União Europeia para este produto lácteo (eurostat -Statistics Explained, 2016).

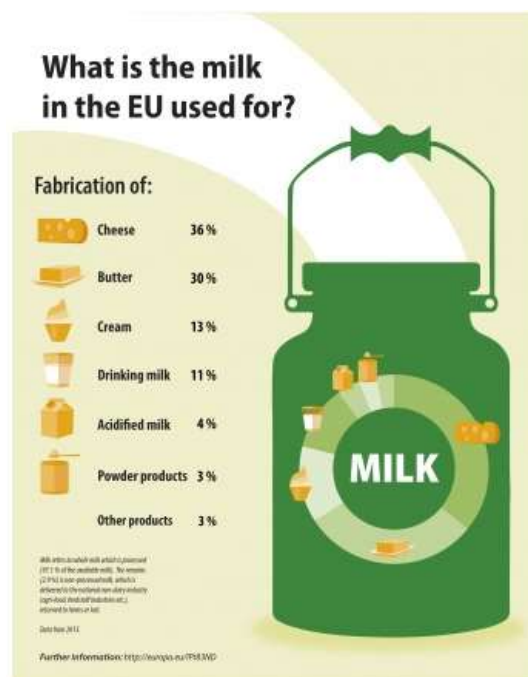


Figura 2 - Destino do leite usado na União Europeia

O grau de autoaprovisionamento do queijo teve uma diminuição gradual ao longo dos anos, passando de valores de 96,8%, que indica que Portugal era quase autossuficiente entre 1980 e 1992, para o valor mínimo de 69,6% em 2015, que indica que Portugal era muito mais dependente da produção de queijo dos outros países. Esta variação do grau de autoaprovisionamento deveu-se a um acréscimo significativo do consumo (INE, 2015). Consequentemente, o queijo e o requeijão continuam a ter maior expressão na importação do que na exportação, dando assim espaço para um aumento

da produção de queijo e requeijão, para a promoção dos produtos nacionais e para a inovação, de forma a equilibrar a balança de compras, ou seja, que as importações possam ter um valor mais aproximado ao das importações (INE, 2016).

A situação da dependência do mercado da importação de queijo já ocorre desde 1986. No período de 1986 a 2001, o queijo foi dos produtos lácteos que teve maior peso no valor total das importações; em média, neste período, registou 43,2% do valor total das importações de produtos lácteos. Esta situação não se manteve sempre desta forma; por exemplo, entre 1980 e 1985, o produto que mais se destacou foi o leite em pó (INE, 2015).

Relativamente à origem das importações de leite e produtos lácteos, Espanha é o país que mais representatividade tem desde 1995, tendo uma representação, em média, de 49,4% do valor total das importações, entre 1995 e 2015. A taxa média anual, em valor, proveniente de Espanha, entre 1988 e 2008, foi de 32,2%, representando 294 milhões de euros em 2008. Em 2015, este país foi o principal fornecedor de todos os produtos lácteos, sendo os mais representativos o iogurte (70,5%) e o queijo (40,1%). Ainda relativamente às importações, os principais países de origem de queijo importado por Portugal são Espanha, Alemanha, França e Países Baixos, enquanto os países para os quais Portugal exporta mais queijo são Angola, Espanha, Estados Unidos e França (INE, 2015).

Quanto aos índices de consumo, em Portugal, o queijo é o terceiro produto lácteo mais consumido, tendo um índice de consumo, em 2015, de 11,7 kg/hab/ano, na sequência de um aumento gradual de consumo ao longo dos anos (1980 e 2015) de 7,9 kg/hab de queijo (Instituto Nacional de Estatística I. P., 2015). Apesar destes valores, em 2012, os maiores produtores de queijo a nível mundial foram os Estados Membros da União Europeia (27), Estados Unidos e Canadá, sendo que dentro dos estados membros da União Europeia, quem produz mais é Alemanha, França e Itália, sendo que em 2012, os maiores consumidores de queijo não eram os mesmos países que produziam mais, o que é possível ver através dos índices de consumo. Em 2012, nos estados membros (27), quem consome mais queijo é França (26,2 kg/*per capita*), Luxemburgo (24,4 kg/*per capita*), Alemanha (24,3 kg/*per capita*) e Finlândia (23,7 kg/*per capita*), sendo o consumo de Portugal em 2012 de 9,6 kg/*per capita* (Figura 3). Por fim, também é de salientar o facto de o queijo ser o único produto lácteo que tem um

consumo maior em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento (Publications, 2013).

Country	1 000 tonnes			Annual growth			kg per capita			
	2010	2011	2012		'11-'12	CAGR	2010	2011	2012	
EU 27	8 603	8 653	8 649	-	0.0%	+	0.3%	17.2	17.3	17.2
Germany	1 919	1 947	1 952	+	0.3%	+	0.9%	23.5	24.2	24.3
France	1 674	1 685	1 664	-	0.1%	-	0.3%	26.6	26.3	26.2
Italy	1 279	1 327	1 274	-	3.9%	-	0.2%	21.1	21.8	20.9
United Kingdom	699	685	703	+	2.6%	+	0.2%	11.3	11.0	11.2
Spain	436	440	436	-	0.8%	+	0.0%	9.5	9.5	9.3
Poland	430	434	434	+	0.0%	+	0.5%	11.3	11.4	11.4
Netherlands	324	324	324		0.0%		0.0%	19.5	19.4	19.4
Sweden	177	180	187	+	4.3%	+	2.9%	18.9	19.0	19.7
Czech Republic	174	172	177	+	3.3%	+	1.0%	16.5	16.2	16.6
Belgium	172	168	170	+	1.0%	-	0.7%	16.0	15.3	15.3
Austria	153	159	164	+	2.6%	+	3.3%	18.2	19.0	19.2
Finland	115	121	128	+	5.4%	+	5.3%	21.4	22.5	23.7
Hungary	115	110	114	+	3.6%	-	0.3%	11.5	11.0	11.5
Portugal	101	102	102		0.0%	+	0.5%	9.5	9.6	9.6
Slovakia	54	56	55	-	1.9%	+	0.7%	10.0	10.3	10.1
Lithuania	46	46	52	+	14.7%	+	6.5%	13.9	14.2	16.3
Latvia	30	30	33	+	11.5%	+	4.7%	14.4	14.3	16.0
Ireland	33	31	31		0.0%	-	3.1%	7.3	6.7	6.7
Estonia	26	27	27		0.0%	+	2.9%	19.6	20.8	20.8
Cyprus	18	15	15		0.0%	-	7.4%	21.6	18.1	18.1
Luxembourg	13	12	13	+	2.3%	-	2.4%	26.4	24.2	24.4
Other	615	602	593	-	1.5%	-	1.8%	12.7	12.5	12.3

Figura 3 - Consumo de queijo nos EU 28 entre 2010 e 2012

2.1.2. Apresentação da empresa “Braz&Irmão, LDA”

A queijaria Braz & Irmão, Lda. (Figura 4), está situada na freguesia de Peraboa, concelho de Covilhã, distrito de Castelo Branco.

Esta empresa familiar começou, como era tradicional na região, com a atividade de cura de queijo, por parte dos pais dos fundadores da empresa. Posteriormente esse negócio foi continuado por um dos sócios, António Brás, que, passados uns anos, se juntou ao seu irmão, José Braz, dando origem a uma sociedade por quotas designada Braz & Irmão, Lda., cuja gerência não se mantém até aos dias de hoje devido ao falecimento do Sr. António, tendo essa quota da gerência sido herdada pelo filho, Eduardo Brás.

A empresa Braz & Irmão Lda. produz e comercializa queijos de vários tipos, fabricados com leite produzido exclusivamente na região da Covilhã, nomeadamente queijo de ovelha curado, queijo de mistura (vaca, ovelha e cabra, ou de ovelha e cabra), queijo de cabra, queijo fresco de vaca, requeijão e travia (requeijão com soro).

Esta empresa iniciou a atividade em 1991, nas caves das casas de ambos os sócios, com uma produção reduzida e um número de empregados também reduzido. Passados alguns anos, em 1995, foi construído um edifício, que ainda se mantém.

Quando a empresa foi transferida para o novo edifício, foi feito logo um grande investimento relativamente a equipamentos, material de laboratório, câmaras de cura, isto é, o essencial para uma queijaria, em 1995. Mais tarde foi necessário comprar um camião para recolha do leite dos vários produtores, construir uma ETAR, tendo inclusivamente sido necessário aumentar o edifício para contruir mais uma câmara com secador e uma sala de expedição maior. Foi ainda adquirida uma máquina termo-seladora e mais uma linha de produção, incluindo cuba e máquina de enchimento de multimoldes.

Logo desde que começou a trabalhar, a queijaria começou a ganhar notoriedade, conseguindo desta forma aumentar a taxa de penetração no mercado nacional devido ao reconhecimento da elevada qualidade dos seus produtos. Enquanto ocupou as instalações antigas, o mercado era fundamentalmente regional e local mas com as novas instalações conseguiu aumentar a capacidade de produção e conseguiu primeiramente conquistar o mercado nacional e posteriormente penetrar em mercados internacionais, como é o caso de França, Espanha, EUA, Brasil, entre outros.

Todos os investimentos realizados tiveram o intuito de conseguir competir com os outros produtores, mantendo a tradição e, ao mesmo tempo, tentar inovar, tendo sempre a preocupação de utilizar matéria-prima da região de forma a contribuir para a economia local.

Em 2009, esta empresa foi a primeira empresa a produzir queijo *kosher* (*queijo com certificação judaica*), o qual até ao momento não produzido há 500 anos , ou seja, conseguiu a certificação *kosher*.

Atualmente a empresa situa-se numa área de 5000 m², sendo a área ocupada pela queijaria de 1600 m² e tendo uma capacidade de produção anual de cerca de 400 toneladas de queijo. Encontra-se enquadrada num projeto de forma a tentar adotar/ implementar os normativos IFS e a ISO 22000:2005.

Demonstrativo da aposta na qualidade que esta industria sempre privilegiou é o facto desta queijaria ter conseguido, em 2001, ganhar um concurso que elegeu os 11 melhores queijos de mistura.



Figura 4 - Queijaria Braz & Irmão, LDA

2.1.3. Caracterização

Segundo a antiga Portaria 73/90 (já revogada), queijo fresco é o produto obtido por coagulação e dessoramento do leite por fermentação láctica, com ou sem adição de coalho e não submetido a um processo de cura.

O queijo fresco (Figura 5) apresenta normalmente uma cor branca, com formato variável mas normalmente cilíndrico, apresentando uma textura suave e consistência mole mas mantendo a forma por algum tempo depois de retirada da respetiva forma.

Quanto ao modo de conservação este produto, perecível e de capacidade de autoconservação muito limitada, deve ser armazenado a temperaturas acima de 0°C e abaixo dos 6°C (João Noronha, 2005).



Figura 5 - Queijo fresco da empresa Braz&Irmão, LDA

2.1.4. Tecnologia de fabrico

O fabrico de queijo fresco resulta de uma série de operações unitárias comuns ao fabrico genérico de queijo: recolha/receção do leite, armazenamento, pasteurização, coagulação, corte e dessoramento, enchimento de cinchos/moldes. O fluxograma de produção do queijo fresco da empresa Braz & Irmão está representado na Figura 6.

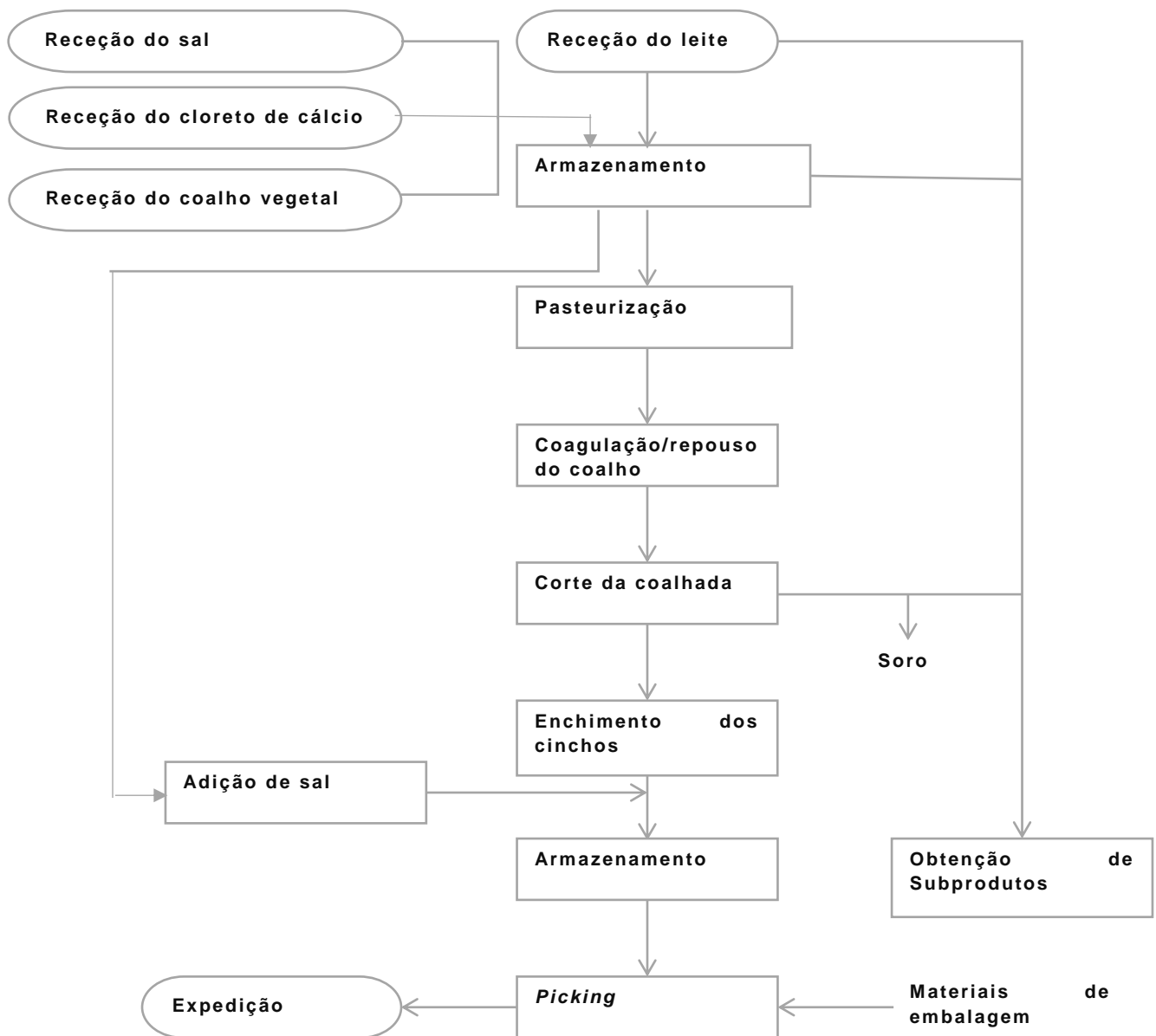


Figura 6 - Fluxograma do queijo fresco

Em primeiro lugar, o leite é rececionado, arrefecido, sendo descarregado para tanques isotérmicos, mantendo a temperatura do leite constante (entre 4º e 6ºC). Em seguida o leite é pasteurizado a 83ºC/15s. Posteriormente o leite é conduzido para

dentro da cuba onde se seguirá a coagulação, operação mediante a qual o leite sofre uma transformação de estado líquido para um estado semissólido (coalhada).

Na cuba de coagulação, o leite é mantido a uma temperatura entre 27°C e 30°C. O processo de coagulação é induzido pela adição de um agente coagulante. O agente coagulante adicionado é um coagulante de origem vegetal, o qual, como a generalidade dos agentes coagulantes, contém proteases que atuam sobre a caseína k, possibilitando que as caseínas sensíveis ao cálcio iónico, presente naturalmente no leite ou adicionado sob a forma de cloreto de cálcio, coagulem durante a fase de repouso que se segue, entre os 45 a 60 minutos.

Uma vez atingido o estado gel, procede-se ao corte do mesmo, com o auxílio de liras mecânicas, de forma a provocar o dessoramento da coalhada. No queijo fresco, o trabalho da coalhada é caracterizado pela colocação da coalhada, manualmente, em cinchos ou formas, para receber o formato pretendido para o produto final. Os cinchos são perfurados de forma a facilitar a saída do soro ainda contido na coalhada e transportados da sala de fabrico para a câmara de refrigeração, onde são armazenados a uma temperatura entre 0º e 6°C.

2.2. Vida útil: Durabilidade/ limite de consumo

Os produtos alimentares, nomeadamente os de teor elevado de humidade, em particular os produtos lácteos, como o queijo fresco, são normalmente perecíveis e necessitam de cuidados adequados para que se possam conservar durante algum tempo, devendo obedecer a critérios de aceitação. Estes critérios implicam normalmente a aposição de menções na rotulagem relacionadas com o tempo de garantia da qualidade dos produtos, normalmente designada por vida útil.

Segundo o CODEX ALIMENTARIUS, a vida útil de um produto alimentar é o intervalo de tempo em que o género alimentício mantém a sua inocuidade e idoneidade microbiológicas quando armazenado à temperatura de armazenamento especificado no rótulo (FAO/OMS, 2009).

A data precedida do termo “consumir de preferência antes de” de um produto alimentar é da responsabilidade do produtor e pode ser determinada através de um estudo de vida útil do produto (Amritkar, 2016).

Um estudo de vida útil indica-nos até que momento o produto alimentar pode ser armazenado e usado sem ocorrerem modificações de qualidade significativas, e inicia-

se logo após o produto ter sido fabricado. Estes testes são apenas uma parte do trabalho para se saber qual a melhor data a colocar no rótulo visto que o produto pode ser ainda seguro mas a qualidade não ser garantida, devido a alterações organoléticas e/ou alterações físico-químicas (García *et al.*, 2008; Amritkar, 2016).

A realização de estudos de vida útil tem benefícios para a empresa que os produz e transforma porque dá a conhecer até que data o produto alimentar é seguro e ao mesmo tempo tem qualidade, não havendo assim sub ou sobre dimensionamento do tempo que realmente dura o produto (García *et al.*, 2008; Amritkar, 2016). Com base nestes estudos, a empresa consegue saber o que pode mudar nos seus procedimentos ou processos de fabrico. Deverá voltar a fazer testes semelhantes, averiguando assim se eventuais alterações, por exemplo, de formulação, embalagem, tecnologia ou uma mistura destes fatores apresenta vantagens a nível de aumento de vida útil, sem comprometer a qualidade e a segurança do produto alimentar em questão. (Amritkar, 2016)

Na União Europeia, os conceitos relacionados com esta temática da vida útil encontram-se no regulamento nº 1169/2011, relativo à rotulagem de géneros alimentícios. Segundo este regulamento, entende-se por “Data de durabilidade mínima de um género alimentício”, a data até à qual o género alimentício conserva as suas propriedades específicas nas condições de conservação adequadas. Quando os géneros alimentícios são muito perecíveis a nível microbiológico e, conseqüentemente, têm uma vida útil muito curta, a menção “Data de durabilidade mínima” deve ser substituído por “Data limite de consumo” (CONSELHO, Regulamento (UE) nº 1169/2011, 2011).

Após a data de durabilidade mínima, o género alimentício pode continuar seguro mas pode já não apresentar a seu padrão de qualidade máxima, enquanto que, após a data limite de consumo, o género alimentício já pode comprometer a saúde do consumidor.

No caso do queijo fresco, o termo a aplicar é “Data limite de consumo” devido à sua perecibilidade microbiológica.

2.3. Fatores que afetam a data limite de consumo nos queijos frescos

A estabilidade de um produto alimentar depende de diversos fatores, podendo ser estes intrínsecos ou extrínsecos. Como exemplos de fatores intrínsecos, temos a qualidade da matéria-prima (a contaminação inicial do produto e a acidez, entre outros), o pH, a atividade da água, o potencial *redox*. Como exemplos de fatores extrínsecos, podemos referir as condições de processamento, a higiene, em especial após a pasteurização do leite, as condições de armazenamento (oscilações de temperatura e humidade), as condições inadequadas de manuseamento, o material de embalagem (Wilbey, 1997; Amritkar, 2016). Estes fatores podem levar a uma diminuição da qualidade e da segurança do género alimentício devido a deterioração microbiana ou não microbiana. A deterioração microbiana tem origem no crescimento microbiano rápido, devido a elevada humidade e temperatura; quando este crescimento é elevado e não é acompanhado com cuidado pode levar ao desenvolvimento de microrganismos, fungos e/ou bactérias, que levam à deterioração dos géneros alimentícios. Para além de consumir o género alimentício ou componentes do mesmo, este crescimento microbiano pode também, em situações de *stress*, levar à produção de substâncias tóxicas que podem provocar intoxicações alimentares.

Como se referiu, a velocidade do crescimento microbiano que leva à deterioração do produto alimentar depende sobretudo das condições de armazenagem, ou seja, da temperatura, da humidade, das condições de manuseamento e do material de embalagem. Os microrganismos podem ser ou não patogénicos.

A deterioração não microbiana tem origem em alterações químicas, induzidas por fatores como a exposição ao ar, que podem originar alterações no sabor (rancificação, por exemplo), alterações de cor e de aroma dos produtos alimentares, para além de perdas de valor nutricional, por exemplo por fotodegradação, que origina perda de vitaminas (Amritkar, 2016).

2.3.1. Possibilidades de aumento da data limite de consumo de queijo fresco

Segundo o regulamento nº1333/2008, os aditivos autorizados para adição aos queijos, como agentes que podem contribuir para o controlo de alterações em queijos, em geral, são sorbatos, nisina, ácido acético, ácido cítrico e fosfatos (CONSELHO, REGULAMENTO (CE) N.º 1333/2008, 2008). No entanto, para além da adição de conservantes, existem outras tecnologias e outras metodologias para aumentar a vida útil de um género alimentício, como é o caso dos tratamentos térmicos, da alteração da

atmosfera em que o género alimentício se encontra, a própria embalagem, da adição de óleos essenciais de ervas aromáticas, da aplicação de estirpes microbianas que produzem bacteriocinas ou mesmo a adição de bacteriocinas, aplicação de altas pressões hidrostáticas, entre outras possibilidades. Estas possibilidades variam na forma de atuação, no modo de aplicação, na sua eficácia, no custo, entre outros fatores, e têm especificidades que podem limitar a sua aplicação em função do género alimentício.

2.3.2. Conservantes

Os conservantes podem ser classificados como antioxidantes ou como antimicrobianos. Enquanto os antioxidantes vão diminuir a velocidade de oxidação dos lípidos e das gorduras dos alimentos de forma a evitar a rancificação e a alteração de cor, os antimicrobianos, tal como o nome indica, reduzem ou inibem o crescimento de microrganismos, como é o caso de leveduras, bolores e bactérias. Através destas ações, os conservantes conseguem aumentar a vida útil dos géneros alimentícios. (Gebretensay, Pal, Shiberu, Abdurahman, & Karanfil, 2015)

Segundo o *Codex Alimentarius*, nos queijos frescos podem utilizar-se vários aditivos, de diversas categorias: reguladores de acidez, estabilizadores/ espessantes, corantes e conservantes. Dentro da categoria dos conservantes, são admitidos os seguintes: ácido sórbico, sorbato de potássio, sorbato de cálcio, nisina, ácido propiónico, propionato de sódio, propionato de cálcio e propionato de potássio. (OMS & FAO, Leche y Productos Lácteos, 2011) O regulamento nº1333/2008, permite a adição a queijos de sorbatos (conservantes), nisina (bacteriocina), ácido acético, ácido cítrico e fosfatos.

O ácido sórbico e o sorbato de potássio inibem o crescimento de alguns microrganismos (*Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella typhimurium*). A sua adição consegue aumentar até 4,5 a 6 semanas a vida útil do queijo *Cottage* com uma concentração de 0,07 a 0,5% (w/w), sendo que doses mais elevadas provocam alterações organoléticas indesejáveis (Ho *et al.*, 2016).

2.3.3. Atmosferas modificadas

Os gases utilizados para aumentar a vida útil dos produtos através da alteração da atmosfera nas embalagens são o azoto e/ou o dióxido de carbono. O seu modo de aplicação varia, podendo ser através da introdução destes gases no espaço de cabeça

da embalagem, através de uma mistura destes gases na massa do género alimentício ou usando carbonato de cálcio (CaCO_3) para produzir dióxido de carbono (CO_2).

Alguns estudos realizados mostraram que quando a alteração da atmosfera é feita no espaço de cabeça, o crescimento de bactérias psicrotróficas, de fungos e de bactérias, é inibido e a vida útil é aumentada até 4-10 semanas, sendo possível verificar alguma alteração de sabor. Quando os gases (N_2 e CO_2) são misturados com a massa/coalhada, observou-se uma inibição do crescimento de bactérias psicrotróficas (*Listeria spp.* e *Pseudomonas spp.*) que levaram a um aumento de vida útil de 9-11 semanas. Por fim, quando foi usado carbonato de cálcio para produzir dióxido de carbono, em concentrações de 0,0175-0,135% (w/w) a vida útil do produto aumentou em 5-6 semanas (Ho *et al.*, 2016).

2.3.4. Embalagem

Segundo a Diretiva 94/62, de 1994, considera-se embalagem “todos os produtos feitos de quaisquer materiais, seja qual for a sua natureza, utilizados para conter, proteger, movimentar, entregar e apresentar mercadorias, desde as matérias-primas até aos produtos transformados, e desde o produtor até ao utilizador ou consumidor.”. Portanto, a embalagem tem a função de proteger os géneros alimentícios do meio ambiente, seja de perigos físicos, químicos e até microbiológicos, assegurando assim a qualidade e a segurança dos produtos alimentares, para além de facilitar o transporte (DIRECTIVA 94/62/CE, Brennan, 2006).

Para além das funções de conter, de proteger e de facilitar o transporte do seu conteúdo, a embalagem tem a função de comunicar com o consumidor e ainda de conservar, por exemplo, através do contributo das atmosferas modificadas ou da presença de compostos que absorvem líquidos e gases, diminuindo o desenvolvimento microbiano (Brennan, 2006).

Um exemplo já estudado do uso da embalagem como forma de aumentar a vida útil é o caso das embalagens de isotiocianato de alilo, uma vez que quando a substância ativa se encontra em concentrações de 0,5-1% (v/w), esta embalagem consegue inibir o crescimento de fungos e de bactérias até 5 semanas, quando o produto se encontra armazenado a 10°C (Ho *et al.*, 2016).

2.3.5. Altas Pressões Hidrostáticas

A tecnologia de alta pressão hidrostática mais conhecida pelas denominações inglesas, *high pressure processing* (HPP), *high hydrostatic pressure* (HHP) ou *ultra high pressure* (UHP), é um processo que consiste em submeter o género alimentício (em qualquer estado físico, embalado ou não) a pressões cujos valores podem oscilar entre 100 e 1000 MPa (equivalente a 1000 e 10000 atmosferas), sendo que a nível industrial as pressões utilizadas variam entre 300 e 700 MPa de forma a tornar o processo viável economicamente (Roldão, 2014).

Esta tecnologia tem a vantagem de preservar o conteúdo nutricional, garantir um nível de segurança alimentar semelhante ao que produz um tratamento térmico como a pasteurização e, ao mesmo tempo, indo ao encontro do que o consumidor dos dias de hoje procura, isto é alimentos processados o mínimo possível, com sabor mais fresco (Roldão, 2014) (Calzada, del Olmo, Picon, Gaya, & Nuñez, 2014).

De acordo com a literatura disponível e a título de curiosidade sabe-se que a primeira aplicação de HPP como uma forma de conservação alimentar foi realizada em 1899, por Bert Hite, que observou que submetendo leite e outros produtos a altas pressões conseguia prolongar o tempo de vida útil comercial destes. No caso do leite, este pioneiro de HPP demonstrou que a pressão necessária para inativar os microrganismos do leite era 650 MPa, aplicada durante 10 minutos à temperatura ambiente (Roldão, 2014).

Nos lacticínios, a tecnologia HPP tem à disposição vários casos de melhoria em áreas como a segurança, oportunidade de expansão, funcionalidade e inovação de produtos. O processamento por altas pressões é dos tratamentos de conservação de alimentos aquele que é suscetível de ser aplicado a produtos sólidos. Em queijo fresco, pode contribuir para a extensão da vida útil e em queijo curado, em geral, pode modular a fase de maturação, sendo uma boa alternativa para a pasteurização a frio de queijos feitos com leite cru. Esta tecnologia pode ser ainda utilizada para fazer a seleção de estirpes de microrganismos devido às diferentes sensibilidades à pressão dos vários microrganismos (Martín, 2016).

2.3.6. Óleos Essenciais/ Compostos Fenólicos

Os óleos essenciais de algumas ervas aromáticas contêm compostos fenólicos que têm capacidade antioxidante e possibilidade de diminuir a deterioração química durante o armazenamento.

O óleo essencial de orégão, no queijo *Cottage*, tem a capacidade de proporcionar um menor grau de deterioração química quando comparado com o queijo *Cottage* sem o óleo essencial; os óleos essenciais de orégão das variedades Cordobes e Criollo têm a particularidade de preservarem os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa evitando assim reações de oxidação. Uma vez que o óleo essencial destas variedades reduz a oxidação de ácidos gordos, a acidez do meio vai ser mais estável e consequentemente pode registar-se uma diminuição da atividade microbiana. A adição deste composto GRAS como conservante natural pode levar à satisfação de uma procura crescente por géneros alimentícios mais saudáveis, com poucos ou nenhuns produtos químicos adicionados, e de origem natural, para além de que os orégãos podem ser cultivados em modo de produção biológico. O óleo essencial de orégão consegue aumentar a vida útil dos alimentos sensíveis e que, devido à sua perecibilidade, tem pouco tempo de distribuição (Asensio *et al.*, 2015).

Os orégãos e a sálvia apresentam timol na sua composição, substância que tem a capacidade de, em concentrações de 40-50 ppm, inibir o desenvolvimento de psicrotróficos, bactérias e fungos, e retardar a proteólise, conseguindo desta forma aumentar a vida útil dos queijos em 1-2 semanas, sendo que a concentração não deve ser superior a 50 ppm porque provoca alteração de sabor a partir desta concentração (Ho *et al.*, 2016).

2.3.7. Biopreservação: Bacteriocinas / Culturas que produzem bacteriocinas

As culturas de microrganismos que são adicionadas aos lacticínios, mais conhecidas por fermentos lácticos, são utilizadas sobretudo para darem o seu contributo a nível tecnológico, papel que pode também incluir um contributo para a conservação através da acidificação e diminuição do pH do meio. No entanto, atribui-se-lhes cada vez mais outras funções, não só na contribuição para alterar as propriedades sensoriais dos géneros alimentícios mas também para ajudar à proteção contra outros microrganismos indesejáveis que podem comprometer a vida útil do produto alimentar e a sua segurança, as chamadas culturas antagonistas ou culturas protetoras. Um outro motivo de adição de culturas designadas por protetoras é que estas proporcionam uma biopreservação, através de bacteriocinas, substâncias que disponibilizam para o meio e que exercem atividade antimicrobiana (Vieira, 2011). Este modo de extensão de vida útil do produto alimentar está cada vez mais presente já que tem a vantagem de não ser um aditivo químico, uma vez que os consumidores estão cada vez mais atentos ao uso destes por parte das indústrias alimentares, na procura crescente de produtos que não

tenham sofrido depreciação nutricional por tratamentos térmicos intensos e de qualidade. (Vieira, 2011)

Através do estudo e desenvolvimento de sistemas antimicrobianos em plantas e animais descobriram-se polipeptídeos antimicrobianos em diversos seres vivos, incluindo microrganismos. Algumas bactérias Gram-negativas, responsáveis pela fermentação do leite, têm a capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos. Estes peptídeos com ação antimicrobiana e produzidos por bactérias são designados por bacteriocinas.

As bacteriocinas apresentam uma grande diversidade a nível de aspeto, atividade, massa molecular, origem genética, natureza química, entre outros, sendo a capacidade de inibir outras bactérias e a sua natureza proteica os únicos pontos de união deste grande grupo de substâncias. A utilização destes fermentos para produção de bacteriocinas no alimento ou da utilização das substâncias purificadas ou parcialmente purificadas diretamente na matéria-prima ou no produto final pode e deve ser considerada como um meio de utilizar substâncias antimicrobianas naturais em produtos alimentares que contribuam para a sua conservação, não sendo um aditivo, associado a um E no que se refere à rotulagem (Vieira, 2011).

O uso destes fermentos e de bacteriocinas tem a grande vantagem de garantir a segurança microbiológica aos consumidores sem provocar efeitos nocivos à saúde e tantas perdas nutricionais como um tratamento térmico como a pasteurização provoca (Vieira, 2011). Em estudos já realizados em queijo fresco, verificou-se que a aplicação de isolados de produtores de bacteriocinas no fabrico de queijo fresco previne o crescimento de bactérias indesejáveis e patogénicas como a *Listeria monocytogenes*, sendo que alguns destes isolados um grande potencial como culturas protetoras no fabrico de queijo (Coelho, 2013).

No mercado existem já diversas bacteriocinas, como é o caso da nisina, pimaricina, MicroGARD™, Enterocina A, Lacticina 3147, Protective, entre outros, algumas de utilização já antiga. No caso da nisina, o crescimento de *Listeria monocytogenes* é retardado mas a Enterocina A consegue inibir o seu crescimento. No caso da pimaricina, os estudos realizados focaram-se no queijo curado em que a vida útil do queijo aumenta entre 1 a 4 semanas, por inibição sobretudo dos bolores superficiais. No que respeita ao MicroGARD, existem estudos em queijo *Cottage* (queijo fresco de pasta acidificada, remotamente semelhante ao queijo fresco português) mostrando que este produto consegue diminuir o crescimento de bactérias Gram-negativas, como é o caso de *Salmonella* e de *Pseudomonas* e ainda alguns fungos,

proporcionando vida útil mais extensa deste tipo de queijo, entre 2-4 semanas, quando normalmente se situa entre 5-7 dias (Ho, Howes, & Bhandari, 2016).

3. Materiais e Métodos

3.1. Plano Experimental

Os ensaios realizados destinaram-se a avaliar o efeito protetor de um produto comercial à base de bacteriocinas, no sentido de avaliar a possibilidade do seu uso como agente de proteção do queijo e de aumento da vida útil do queijo fresco, objetivo principal do trabalho.

Numa primeira fase, os ensaios destinaram-se a estudar a forma mais eficaz para a adição do produto. Testou-se a aplicação do produto no leite e na coalhada, procedendo-se, após 2, 6, 10 e 15 dias de conservação do queijo, à análise do queijo, quer microbiológica (contagem de bactérias psicrótróficas, contagem total de mesófilos e coliformes) quer de índole físico-química (parâmetros relacionados com a conservação do produto, pH, resíduo seco e atividade da água), tendo sempre queijos para controlo (em que não se aplicou produto mas que resulta do mesmo leite e que é sujeito às mesmas condições dos outros). A recomendação é a aplicação do produto no leite. Por isso, quando a aplicação foi efetuada na coalhada, a dose aplicada foi metade da dose recomendada uma vez que o produto é hidrossolúvel e para obtenção da coalhada são removidos cerca de 80% de água, sob a forma de soro.

Após definição da adição mais eficaz, procedeu-se a uma segunda fase de ensaios, que consistiu em adicionar (à coalhada ou ao leite) a dose recomendada, uma dose exagerada, uma dose intermédia e mantendo como controlo uma parte dos queijos em que não se adicionou produto e que foram sujeitos às mesmas condições. Nesta segunda fase procedeu-se aos mesmos testes analíticos do queijo realizados na primeira fase.

3.2 Materiais

3.2.1 Leite

O leite de vaca pasteurizado é a matéria-prima do queijo fresco, a qual tem características químicas e microbiológicas que variam ao longo do ano, dependendo de diversos fatores entre os quais a alimentação, estado de saúde do animal, estado fisiológico, ambiente em que se encontra inserido, clima, entre outros. Como tal é fundamental controlar os vários parâmetros do leite ao longo do ano, para saber a

qualidade do leite e consequentemente como atuar nas formulações para que o produto final seja minimamente homogêneo ao longo do ano.

Os lotes de leite utilizados nos ensaios foram sempre caracterizados de forma a garantir boas condições para utilização dos mesmos nos ensaios.

3.2.2. Bacteriocinas de bactérias lácteas –Protective

O produto utilizado foi o Protective, comercializado pela empresa ABIASA. Tal como o divulgado pela empresa, o Protective consiste num extrato natural que confere proteção ao leite/queijo devido à presença de pequenos péptidos inibidores (bacteriocinas). Este produto caracteriza-se por diminuir o crescimento microbiano indesejável, não afetando o crescimento microbiano de bactérias produtoras de ácido láctico, sendo por isso que não afeta a maturação natural dos queijos.

A ABIASA aconselha a adição de 250 mL por cada 1000 L de leite, logo após a ordenha (Anexo I – Ficha Técnica de Protective).

3.3. Métodos

3.3.1. Ensaios preliminares

Como foi referido no plano experimental, a primeira fase consistiu em averiguar qual a forma mais eficaz de adicionar o Protective, na coalhada ou no leite. Para tal, fizeram-se ensaios em 2 lotes (2 fabricos diferentes, em 2 dias diferentes, uma vez que o leite não é sempre igual). Com cada lote de leite, foram feitos os seguintes ensaios

- Adição ao leite de 250 mL/1000 L de leite
- Adição à coalhada equivalente a 125 mL/1000L leite, sendo feito a respetiva adaptação dos litros de leite para a massa da coalhada
- Fabrico normal – controlo, sem adição

3.3.2. Ensaios de concentração de Protective

Como a adição que teve melhores resultados foi a adição ao leite (ver Resultados e discussão), tanto a nível de resultados de análises químicas e microbiológicas como a nível sensorial, estes ensaios de concentração de Protective foram feitos adicionando o produto ao leite.

Estes consistiram em variar a concentração de Protective, e averiguar qual a melhor concentração no sentido do aumento da data limite de consumo. Para tal fizeram-se os seguintes ensaios:

- Adição da dose recomendada (250 mL/1000 L de leite)
- Adição de mais 50% da dose recomendada (375 mL/1000 L de leite)
- Adição de mais 25% da dose recomendada (312,5 mL/1000 L de leite)
- Fabrico normal – controlo.

A variação de concentração foi sempre feita com a dose recomendada e com concentrações acima da dose recomendada devido ao facto de nos ensaios preliminares não se ter verificado um aumento da data limite de consumo.

3.3.3. Métodos Analíticos

O leite que foi utilizado para o fabrico de queijo fresco foi recolhido na empresa, antes da pasteurização tal como todos os leites utilizados nos outros fabricos, sendo a amostra mantida entre 0° e 4°C até à sua recolha, para análise, por parte da empresa Brito Rocha, até às 24 horas seguintes, sempre mantidos entre 0° e 4°C.

Nas quatro amostras referentes aos leites utilizados nos 2 fabricos foram realizadas as seguintes análises físico-químicas e microbiológicas de caracterização:

- Quantificação de Microrganismos totais a 30°C, utilizando a ISO 4833 -1: 2013
- Substâncias Inibidoras/Antibióticos, utilizando o método DELVOTEST, baseado na inibição da atividade microbiana
- Contagem de Células Somáticas, segundo a ISO 13366-1:2008
- Teores em Gordura e Proteína, segundo a ISO 21543:2006
- Teor em Lactose, segundo a ISO 21543:2007
- Teor em Extrato Seco Desengordurado, segundo a ISO 21543:2008
- Índice Crioscópico, segundo a norma PT-FQ-82.02 (Lab. BR)
- Teor em Ureia, segundo o método AFNOR NF V 04-217: 1992

Após o embalamento, os queijos permaneceram na câmara de frio na empresa Braz & Irmão, LDA, conforme os procedimentos correntes da empresa. No dia subsequente ao fabrico e ao fim de 6 e 10 dias de conservação, foram analisados pelo laboratório. As amostras de queijo fresco foram submetidas à seguinte caracterização:

- Quantificação de Microrganismos Psicotróficos, com base na metodologia da ISO 4833-1:2013
- Quantificação de Microrganismos totais a 30°C, segundo a ISO 4833-1:2013
- Quantificação de Coliformes totais, segundo a ISO 4832:2006
- Quantificação de Estafilococos coagulase positivos, segundo a ISO 6888-2:1999
- Pesquisa de *Salmonella spp* segundo a ISO 6579:2002
- Pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo a ISO 11290-1:2002
- pH, segundo a norma NP 3441:2008, através do uso de um potenciômetro
- Atividade da água segundo metodologia do Lab BR, baseada nas normas NP 516:2000 e NP 115:1965
- Resíduo Seco (180°C) segundo a metodologia interna PT-FQ 161.02 (Lab. BR)

As determinações foram efetuadas em triplicado.

3.3.4. Análise sensorial

A análise sensorial foi feita pelos funcionários da empresa, com alguma rotina de avaliação do queijo fabricado na empresa; pretendeu-se obter opinião sobre os queijos, no que se refere a semelhanças, diferenças e preferências. Para o feito, utilizou-se um questionário onde cada funcionário deu a sua opinião relativamente a cada queijo em cada um dos dias de conservação correspondentes à avaliação, nos dias 2, 6 e 10 após o fabrico. Cada amostra foi classificada numa escala de 1 a 5 (em que 1 é péssimo e 5 é ótimo) relativamente ao sabor, à textura e ao aspeto, tendo ainda sido questionado qual a amostra preferida (ficha de avaliação no Anexo II).

3.3.5. Análise de resultados

Todos os ensaios foram realizados em 3 repetições, tendo logo no fabrico sido laborados os queijos suficientes para a análise em triplicado de forma a ser possível realizar a análise estatística.

Os resultados foram analisados com o recurso à análise de variância, utilizando-se o *software* Statistica, considerando-se como fatores a modalidade de ensaio e o tempo de conservação do queijo. Foi utilizado o teste de Tukey para comparação dos grupos em função da interação entre os dois fatores, modalidade e tempo de conservação, considerando dois níveis de confiança (95% e 99%).

A informação foi organizada por blocos consoante o tipo de ensaio (utilização de apenas o leite de um produtor e utilização do leite de três produtores), tempo de conservação (2, 6, 10 dias) e o modo de aplicação do produto (controlo, adição no leite, adição na coalhada, adição da dose recomendada, adição de 25% a mais da dose recomendada e 50% a mais da dose recomendada) e o parâmetro que foi analisado. Para cada parâmetro foram calculadas as médias e os desvios-padrão.

4.Resultados e Discussão

4.1. Estudo do momento de aplicação do produto

4.1.1 Caracterização do leite

A componente experimental foi realizada em 2 fases. A primeira compreendeu dois fabricos diferentes, no 1º fabrico foi apenas utilizado o leite de um produtor (nº205) e no 2.º fabrico foi utilizado o leite de três produtores (nº 4, 6 e 225). Na segunda fase foi usado apenas leite de um produtor. Nas Tabelas 2 e 3 é possível observar os resultados das análises do leite cru usado para os fabricos de queijo fresco. Conclui-se que apenas para um dos leites (produtor nº225) se verificou um resultado fora dos valores de referência, para a contagem de células somáticas.

Tabela 2 - Resultados da análise ao leite cru no dia 04 de Abril de 2017

Produtor	205	4	6	225	Unidades	Valores de referência
Quantificação de Microrganismos totais 30°C	18000	20000	240000	30000	ufc/mL	≤ 100000
Substâncias Inibidoras/ Antibióticos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		Negativo
Gordura total	4,03	4,32	3,18	4,15	%	3,2 -3,4
Proteína total	3,23	3,37	3,22	3,35	%	3-3,3
Lactose	5,53	5,37	5,71	5,54	%	4,5
Extrato seco Desengordurado	8,68	8,67	8,83	8,81	%	8,2-8,7
Índice Crioscópico	-0,526	-0,523	-0,534	-0,532	°C	- (0,54-0,59)
Ureia	224	343	194	284	ppm	
Células somáticas	362	691	267	1004	(x1000 cél./mL)	≤ 400 000

Tabela 3 - Análises ao leite cru no dia 12 de Julho de 2017

Produtor	205	Unidades	Valores de referência
Microrganismos totais 30°C	83000	ufc/mL	≤ 100000
Substâncias Inibidoras/ Antibióticos	Negativo		Negativo
Gordura total	3,68	%	3,2 -3,4
Proteína total	3,16	%	3-3,3
Lactose	5,5	%	4,5
Extrato seco Desengordurado	8,58	%	8,2-8,7
Índice Crioscópico	-0,528	°C	0,05
Ureia	239	ppm	
Células somáticas	376 000	(x1000 cél./mL)	≤ 400 000

4.1.2. Caracterização do queijo

4.1.2.1. Caracterização físico-química e microbiológica

A análise de variância efetuada relativamente aos ensaios planeados para avaliação do momento mais adequado de adição do produto revelou influência significativa da modalidade de adição do produto nas características do queijo, sobretudo a nível das características microbiológicas, decisivas no que se refere à vida útil do queijo fresco (Tabela 4). Como seria de esperar, o tempo revelou também efeito muito significativo na evolução da componente microbiana do queijo.

Tabela 4 - Resultados da análise de variância efetuada relativamente às características do queijo (1ª fase)

	log CMT 30°C	log Psicrotróficos	log Coliformes totais	pH	RS (180°C)	Atividade da água
Tempo	**	**	**	**	ns	**
Modalidade	**	*	**	ns	**	ns
Tempo x Modalidade	*	**	**	ns	ns	*

** : p<0,01; * : p<0,05; ns: não significativo

Este efeito do tempo foi sempre no sentido da depreciação das características do queijo, quer microbiológicas quer no pH, reflexo também da atividade microbiana, com a contribuição também do fator modalidade de adição do Protective, como se pode observar nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Resultados médios dos parâmetros pH, Resíduo seco e Atividade da água em função das modalidades de adição do Protective e do tempo de conservação.

Modalidade	Tempo de Conservação	pH	Resíduo Seco (180°C)	Atividade da água
Controlo	2 dias	6,62 ^a	70,50 ^b	0,65 ^b
	6 dias	6,54 ^a	71,00 ^b	0,81 ^a
	10 dias	5,23 ^b	70,17 ^b	0,39 ^d
Adição ao leite	2 dias	6,59 ^a	79,17 ^a	0,65 ^b
	6 dias	6,57 ^a	79,83 ^a	0,79 ^a
	10 dias	5,41 ^b	79,33 ^a	0,52 ^c
Adição à coalhada	2 dias	6,61 ^a	73,50 ^b	0,65 ^b
	6 dias	6,51 ^a	72,50 ^b	0,78 ^a
	10 dias	5,43 ^b	74,00 ^b	0,52 ^c

Nota: em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas (p<0,01)

Para uma análise dos resultados obtidos, na Tabela 5, podemos observar a evolução dos parâmetros físico-químicos médios ao longo do tempo de conservação, em função da modalidade de adição do produto. Pode observar-se que aos 6 dias de conservação, para qualquer uma das duas modalidades de adição e sem diferenças significativas entre elas ($p>0,01$), o pH diminui mas ainda apresentou valores aceitáveis, próximos de 6,6, portanto, pouco inferiores ao pH normal do leite ou do queijo fresco. Para ambas as modalidades, aos 10 dias, o pH diminui significativamente ($p<0,01$), atingindo níveis muito baixos (inferiores a 5,5), revelando potencial impacto nas propriedades sensoriais do queijo.

O resíduo seco a 180°C foi sempre inferior nos fabricos controlo, o que pode estar relacionado com a manipulação da coalhada no caso da aplicação do produto na coalhada; no caso da aplicação no leite, verificou-se o maior nível de resíduo seco. A atividade da água mostra, tal como o resíduo seco, uma evolução pouco esperada, com alguma flutuação, embora com tendência clara para diminuir a partir dos 6 dias (Tabela 5). A diminuição intensa do pH do sexto para o décimo dia, para valores muito baixos, denota a atividade da carga microbiana, que se acentua a partir dos 2 dias e em que os microrganismos psicrotróficos dominam. De facto, através da observação da tabela 6, conclui-se que os psicrotróficos apresentam resultados ao nível da contagem total de microrganismo.

Tabela 6 - Resultados médios dos parâmetros microbiológicos (log10 ufc/g) em função das modalidades de adição de Protective e do tempo de conservação.

Modalidade	Tempo de conservação	CMT 30°C	Psicrotróficos	Coliformes totais
Controlo	2 dias	4,93 ^b	4,63 ^c	3,33 ^b
	6 dias	6,46 ^a	5,47 ^b	4,07 ^a
	10 dias	6,67 ^a	6,34 ^a	4,47 ^a
Adição ao leite	2 dias	4,71 ^{bc}	4,22 ^{cd}	2,02 ^c
	6 dias	6,43 ^a	5,41 ^b	4,08 ^a
	10 dias	6,61 ^a	6,33 ^a	4,57 ^a
Adição à coalhada	2 dias	4,31 ^c	3,84 ^d	2,25 ^c
	6 dias	6,26 ^a	5,66 ^b	4,10 ^a
	10 dias	6,66 ^a	6,38 ^a	4,57 ^a

Nota: em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas ($p<0,01$)

Em comparação com o controlo, o Protective parece ter algum efeito de proteção até aos 2 dias; para qualquer das modalidades de adição, aos 2 dias de conservação a componente microbiana analisada, designadamente psicrotróficos e, sobretudo,

coliformes, foi significativamente superior ($p < 0,01$) nas amostras de queijo do controlo mas ao fim de 6 dias essa diferença esbateu-se e os resultados foram semelhantes ($p > 0,01$).

Em qualquer das modalidades, nota-se perfeitamente o contexto evolutivo dos microrganismos do queijo que acentuam a descida do pH do mesmo, o qual não é contrariado pela desidratação do queijo, como demonstram os resultados do resíduo seco (180°C) e da atividade da água.

Nas figuras 7, 8 e 9 encontram-se os gráficos relativos à evolução da contagem de mesófilos totais a 30°C , da contagem de psicrotróficos e da contagem de coliformes, respetivamente, sendo possível verificar a evolução das mesmas ao longo do tempo de conservação e o crescimento destes microrganismos consoante o modo ou modalidade de aplicação.

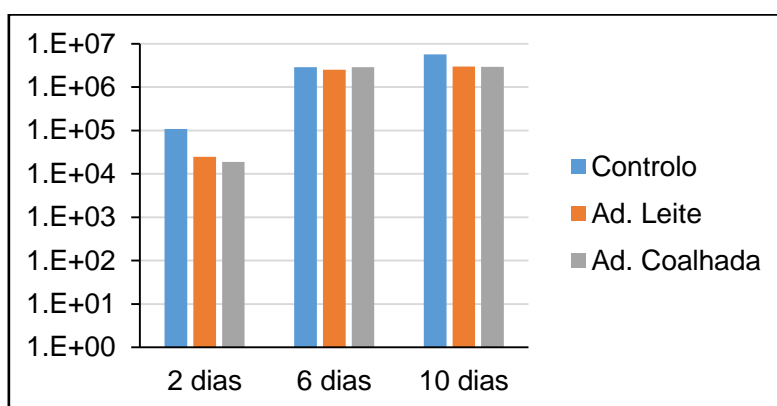


Figura 7 - Gráfico de contagem de mesófilos totais a 30°C (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado à coalhada

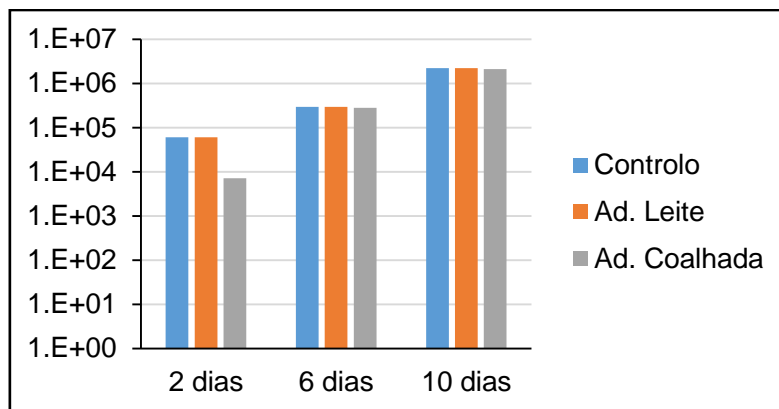


Figura 8 - Gráfico de contagem de psicotróficos (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controle, em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado à coalhada

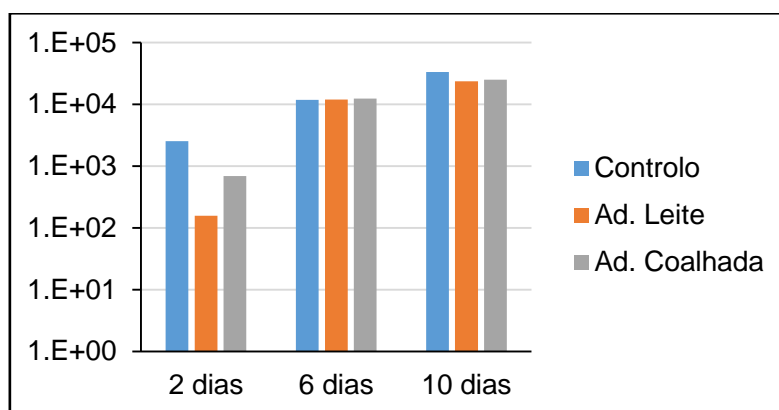


Figura 9 - Gráfico de contagem de coliformes (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controle, em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado à coalhada

Como se referiu e é possível ver nas figuras supramencionadas, a componente microbiana variou significativamente com o tempo de conservação, com a modalidade, e com a interação entre os dois fatores.

As contagens dos microrganismos aumentaram substancialmente dos 2 para os 6 dias de conservação, permanecendo depois sem evolução muito intensa. Parece que o efeito do antimicrobiano dura menos de 6 dias, embora pareça ter algum efeito (ligeiro) de controlo dos microrganismos aos dois dias, mais notório na aplicação ao leite. Este efeito é mais notório no caso dos coliformes, em que o controlo está, aos dois dias, com contagens mais elevadas (1 ciclo logarítmico) que no caso da aplicação de Protective.

Parece, assim, haver alguma proteção, contudo muito limitada no tempo, entre 2 e 6 dias. Neste período, os resultados sugerem que a adição do Protective e a

modalidade de adição do mesmo não prejudicam o queijo. Talvez se possa até considerar o incremento da proteção através do aumento da dosagem.

4.1.2.2. Análise sensorial

Os resultados pormenorizados relativos à análise sensorial do queijo fresco encontram-se no Anexo III e VI, relativamente aos quais uma síntese pode ser observada nas Tabelas 7 e 8. O único fator que influenciou significativamente os resultados foi a modalidade de adição, para qualquer dos parâmetros organoléticos avaliados.

Tabela 7 - Resultados da análise de variância efetuada relativamente à avaliação sensorial do queijo (1ª fase)

	Sabor	Textura	Aspeto
Tempo	ns	ns	ns
Modalidade	**	**	*
Tempo x Modalidade	ns	ns	ns

**: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; ns: não significativo

Pela análise dos resultados pode concluir-se que a amostra preferida pelos inquiridos foi a amostra cuja adição do produto foi feita no leite, revelando-se superior relativamente a todas as características avaliadas (Tabela 8), com uma textura mais mole, mais fresca, mais húmida, tendo superado mesmo a amostra de queijo igual ao que se faz atualmente nesta queijaria. A amostra cuja adição foi feita na coalhada ficou com uma textura um pouco “encortiçada”, mais dura, não correspondendo às características apreciadas pelos consumidores da região, mas, mesmo assim, com resultados ligeiramente superiores ao controlo, embora as diferenças não se tenham revelado significativas. Ao segundo dia, as amostras cuja adição foi feita na coalhada e a amostra controlo estavam muito semelhantes. A amostra cuja adição foi feita no leite, ao segundo dia, permitia fazer fatia mas esta desfazia-se com facilidade, sendo que ao sexto dia tal aspeto já não se verificava apesar de continuar com as características desejadas. Tal facto poderá dever-se à diferença do corte da coalhada, uma vez que apenas nas amostras cuja adição foi feita ao leite, o corte da coalhada foi feito manualmente através do uso de liras mais pequenas mas que provocavam coágulos de massa de maior dimensão.

Tabela 8 - Resultados médios dos parâmetros sensoriais em função das modalidades de adição de Protective e do tempo de conservação

Modalidade	Tempo de conservação	Sabor	Textura	Aspeto
Controlo	2 dias	3,6 ^{ac} ± 0,9	3,6 ^a ± 0,9	3,9 ^b ± 0,9
	6 dias	3,1 ^a ± 1,0	3,3 ^a ± 1,2	3,6 ^a ± 1,2
Adição ao leite	2 dias	4,3 ^{bc} ± 0,9	4,5 ^b ± 0,6	4,4 ^b ± 0,8
	6 dias	4,5 ^b ± 0,9	4,5 ^b ± 0,9	4,3 ^b ± 0,9
Adição à coalhada	2 dias	3,8 ^{abc} ± 0,8	3,8 ^{ab} ± 0,9	4,2 ^b ± 0,8
	6 dias	3,9 ^{bc} ± 0,9	3,9 ^{ab} ± 0,8	4,2 ^b ± 0,8

Nota: em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,01$)

Em resumo, avaliação organolética foi sobretudo influenciada pela modalidade de adição do produto em teste, para qualquer das características avaliadas, tendo sido a adição de Protective no leite que conferiu melhores características organoléticas sendo por isso e pelos resultados físico-químicos e microbiológicos o modo de adição escolhido para proceder à segunda fase do estudo, apesar dos resultados não terem sido estatisticamente significativos.

4.2. Estudo da dose de adição

4.2.1 Caracterização do leite (2ª fase de estudo)

Tal como foi referido, nesta segunda fase utilizou-se apenas o leite de um produtor (nº 205), cujos parâmetros analíticos (Tabela 3) se encontravam relativamente dentro dos valores de referência.

4.2.2 Caracterização do queijo

4.2.2.1 Caracterização físico-química e microbiológica

A análise de variância efetuada relativamente aos ensaios planeados para avaliação da dose de adição efetuada do produto (Tabela 9), revelou que houve influência muito significativa na concentração de Protective (modalidade) que influenciou as características microbiológicas e as físico-químicas o que não foi de encontro ao que se estava à espera. Tal como na primeira fase o tempo também revelou um efeito muito significativo nas características microbiológicas o que consequentemente afetou as características físico-químicas, tal deve-se ao facto de o pH ser alterado pelas reações químicas realizadas pelos microrganismos e a atividade da água ser um dos indicadores de atividade microbiana.

Tabela 9 - Resultados médios dos parâmetros microbiológicos (\log_{10} ufc/g) em função das modalidades de adição de Protective e do tempo de conservação.

	log CMT 30°C	log Psicrotróficos	log Coliformes totais	pH	RS (180°C)	Atividade da água
Tempo	**	*	**	**	**	**
Modalidade	**	**	**	**	**	**
Tempo x Modalidade	*	ns	**	**	**	ns

** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; ns - não significativo

O pH ao longo dos 6 dias observou sempre uma descida constante, sendo a mais acentuada no queijo fresco obtido com a adição da dose recomendada entre o 6º e o 10º dia, em que houve uma descida de 6,12 para 4,98 sendo também os queijos frescos com a dose recomendada analisados no 10º dia os que apresentam uma maior variabilidade de valores de pH (Tabela 10).

O resíduo seco, na generalidade, diminuiu sempre ao longo do tempo o que se deve ao dessoramento e à secagem do queijo, muito embora ele se encontrasse sempre embalado após o 2º dia de vida; o que apresentou sempre valores de resíduo seco mais elevados foram os queijos frescos com a dose recomendada o que na análise sensorial originou um queijo com a massa mais seca e mais firme (Tabela 10). A atividade da água diminuiu sempre ao longo do tempo independentemente da concentração.

Tabela 10 - Resultados médios de pH, RS e Atividade da água efetuados dos queijos frescos (2ª fase)

Modalidade	Tempo de conservação	pH	RS (180°C)	Atividade da água
Controlo	2 dias	6,62 ^a	72,66 ^d	0,98 ^a
	6 dias	5,99 ^c	71,33 ^d	0,42
	10 dias	5,01	72,67 ^d	0,44
DR0	2 dias	6,60 ^a	79,00 ^a	0,98 ^a
	6 dias	6,12 ^b	78,67 ^a	0,52
	10 dias	4,98	74,00 ^{cd}	0,51
DR25	2 dias	6,63 ^a	78,00 ^{ab}	0,98 ^a
	6 dias	6,16 ^b	77,33 ^{abc}	0,52
	10 dias	5,07	74,00 ^{cd}	0,53
DR50	2 dias	6,60 ^a	76,67 ^{abc}	0,98 ^a
	6 dias	5,93 ^c	78,00 ^{ab}	0,53
	10 dias	5,08	74,67 ^{bcd}	0,53

Nota: em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,01$)

Através da análise da Tabela 11 e dos gráficos seguintes (Figuras 10,11 e 12), da análise microbiológica realizada no queijo fresco ao longo da conservação, pode-se inferir que independentemente da concentração o Protective conferiu um poder de proteção relativamente aos coliformes totais e uma ligeira proteção em relação aos mesófilos totais.

O crescimento microbiano não foi, de facto, semelhante nos grupos de microrganismos analisados. No caso dos mesófilos, o crescimento foi gradual ao longo do tempo sendo que aos 10 dias o crescimento microbiano já se encontrava relativamente semelhante nos queijos frescos, independentemente da concentração de Protective que foi adicionada. Ao 6º e 10º dia os queijos frescos que tinham maiores contagens de mesófilos eram aqueles a que foi adicionada maior quantidade de bacteriocinas, ou seja, a quantidade de bacteriocinas pelo menos acima de 375 mL/1000 L (DR50) não é vantajosa para o controlo do crescimento de mesófilos nos queijos frescos, porque os queijos frescos com esta concentração chegam a apresentar valores de mesófilos superiores aos queijos frescos em que não foram adicionadas bacteriocinas, parecendo ser um resultados de certa forma estranho.

Tabela 11 - Resultados médios dos parâmetros pH, Resíduo seco e Atividade da água em função das modalidades de concentração de Protective e do tempo de conservação.

Modalidade	Tempo de conservação	log CMT 30°C	log Psicrotróficos	log Coliformes totais
Controlo	2 dias	5,22	5,11	0
	6 dias	6,38 ^{cd}	5,73 ^b	2,57 ^e
	10 dias	7,70 ^{ab}	5,98 ^{ab}	5,22 ^{ab}
DR0	2 dias	5,23	5,09	0
	6 dias	6,11 ^d	5,58 ^{bc}	3,46 ^{cd}
	10 dias	8,02 ^b	5,86 ^{ab}	5,87 ^a
DR25	2 dias	5,31	5,28 ^{cd}	0
	6 dias	6,13 ^d	5,79 ^{ab}	2,92 ^{de}
	10 dias	7,88 ^b	5,90 ^{ab}	5,07 ^a
DR50	2 dias	5,25	5,08	0
	6 dias	7,10 ^{bc}	6,12 ^a	3,82 ^c
	10 dias	8,37 ^b	6,08 ^a	4,80 ^b

Nota: em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas (p<0,01)

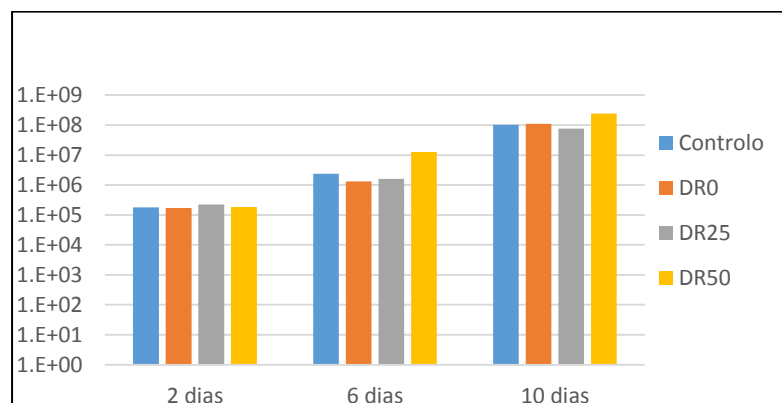


Figura 10 - Gráfico de contagem de mesófilos totais a 30°C (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, DR0, DR25 e DR50 em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado ao leite

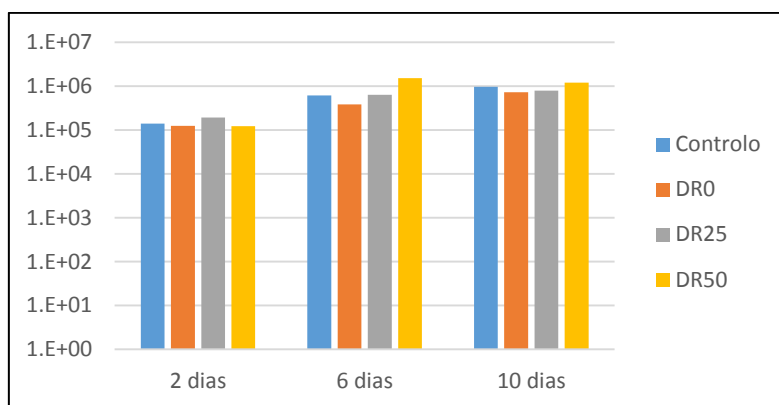


Figura 11 - Gráfico de contagem de Psicotróficos (log ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, DR0, DR25 e DR50 em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado ao leite

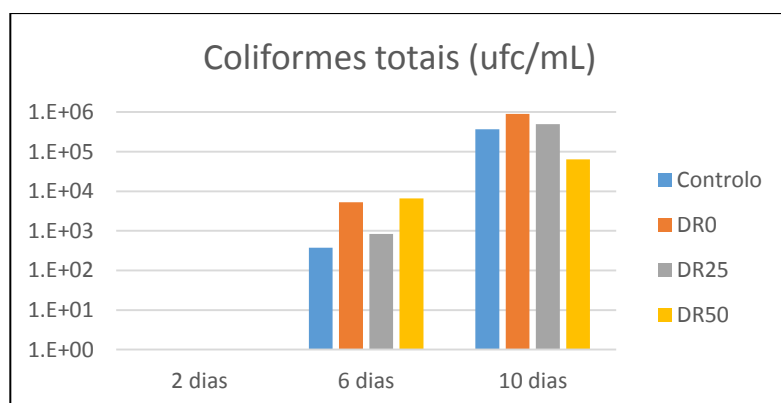


Figura 12 - Gráfico de contagem de Coliformes Totais (ufc/mL) presentes nos queijos frescos controlo, DR0, DR25 e DR50 em que o Protective foi adicionado ao leite e em que o Protective foi adicionado ao leite

4.2.2.2. Análise sensorial

Os resultados relativos à análise sensorial dos queijos frescos com diferentes concentrações de Protective encontram-se no Anexo V, relativamente aos quais se fez uma análise de variância da qual por sua vez resultou a seguinte tabela 12, também à semelhança da primeira fase apenas a modalidade afetou significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros organoléticos avaliados.

Tabela 12 - Resultados da análise de variância efetuada relativamente à análise sensorial do queijo (2ª fase)

	Sabor	Textura	Aspeto
Tempo	ns	ns	ns
Modalidade	ns	*	*
Tempo x Modalidade	ns	ns	ns

* - $p < 0,05$

Tabela 13 - Resultados médios dos parâmetros sensoriais em função das modalidades de concentração de Protective e do tempo de conservação

Modalidade	Tempo de conservação	Sabor	Textura	Aspeto
Controlo	2 dias	$3,9 \pm 0,7$	$3,9 \pm 0,7$	$4,0 \pm 0,7$
	6 dias	$3,6 \pm 0,8$	$3,7 \pm 1,3$	$3,9 \pm 1,1$
	10 dias	-	-	-
DR0	2 dias	$3,7 \pm 1,3$	$3,4 \pm 1,3$	$3,2 \pm 1,3$
	6 dias	$3,8 \pm 0,9$	$4,1 \pm 1,0$	$4,2 \pm 0,9$
	10 dias	-	-	-
DR25	2 dias	$3,7 \pm 1,4$	$3,4 \pm 1,2$	$3,5 \pm 1,3$
	6 dias	$3,9 \pm 0,9$	$4,1 \pm 1,0$	$4,2 \pm 1,0$
	10 dias	-	-	-
DR50	2 dias	$3,8 \pm 1,1$	$3,6 \pm 1,0$	$3,7 \pm 1,1$
	6 dias	$4,4 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,7$	$4,5 \pm 0,7$
	10 dias	-	-	-

Através da análise aos resultados da análise sensorial (Tabela 13) é possível verificar que ao segundo dia a amostra preferida foi aquela que não sofreu adição de Protective, devido ao facto de ao 2º dia, os queijos, onde foi adicionado o produto, ainda se encontrarem muito moles. Ainda necessitavam de mais tempo de dessoramento e sendo ligeiramente difícil cortar uma fatia perfeita, sendo que em 10 provadores, 4 preferiram a amostra controlo mas 6 preferiram as amostras em que no seu fabrico foi adicionado Protective. Tal opinião, no sexto dia ainda se afirmou mais, visto que nenhum provador preferiu a amostra controlo e portanto todos preferiram

as amostras com a adição do produto sendo a preferida a adição com a dose recomendada, apesar das pontuações dadas darem a preferência às amostras em que foi adicionado 50% a mais da dose recomendada. Como aconteceu na primeira fase do estudo ao décimo dia, todos os queijos se encontravam azedos e impróprios para consumo.

5. Conclusões

Após a realização destes estudos verificou-se que o Protective é mais eficiente quando adicionado ao leite, uma vez que é a forma de adição que confere ao queijo fresco melhor textura e uma melhor proteção microbiológica. Na segunda fase de estudo verificou-se que a concentração que apresentou melhores resultados foi a DR25 e que concentrações de Protective pelo menos iguais ou superiores a DR50 deixam de ser vantajosas a nível microbiológico, uma vez que os queijos com DR50 apresentaram resultados semelhantes aos queijos frescos em que não se adicionou Protective.

Apesar da adição de Protective ter aspetos positivos, estes não conseguem cumprir de forma completa o objetivo desejado, uma vez que não se verificou a inibição do crescimento de microrganismos nem conseguiu que não se verificasse alterações de sabor; o queijo fresco continuou seguro a nível microbiológico até aos 10 dias após o fabrico, sob conservação, mas com um sabor ácido/azedo que já não permite ter a comercialização do produto.

Na prática, não foi possível ganhar vantagem relativamente à vida útil do queijo em comparação com os processos atualmente em uso na queijaria.

No futuro sugiro um estudo sobre a aplicação de método de barreiras (Protective, utilização de um compósito que absorva o soro e não altere a textura, HPP, atmosfera modificada, entre outros), uma vez que este método é essencial para evitar a contaminação do produto através de contaminações cruzadas. O estudo de formas de aumento da vida útil do queijo fresco é fundamental de forma a que as queijarias consigam vender o seu produto durante um período de tempo mais longo sem ao mesmo tempo afetar a qualidade do produto.

6. Referências Bibliográficas

- Amritkar, P. (12 de Março de 2016). *Linkedin*. Obtido em 30 de Maio de 2017, de Shelf Life - Understanding the Basics: <https://www.linkedin.com/pulse/shelf-life-understanding-basics-priti-amritkar>
- Asensio, C., Grosso, N., & Juliani, H. (March de 2015). Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 664-671.
- Brennan, J. G. (Ed.). (2006). *Food Processing Handbook*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Calzada, J., del Olmo, A., Picon, A., Gaya, P., & Nuñez, M. (May de 2014). Using High-Pressure Processing for Reduction of Proteolysis and Prevention of Over-ripening of Raw Milk Cheese. *Food & Bioprocess Technology*, 7(5), 1404-1413.
- Coelho, M. C. (2013). *Isolamento e caracterização de bactérias do ácido láctico, produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no fabrico de queijo fresco*. Angra do Heroísmo: Universidade dos Açores.
- CONSELHO, P. E. (2008). REGULAMENTO (CE) N.º 1333/2008. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 354/16.
- CONSELHO, P. E. (25 de Outubro de 2011). Regulamento (UE) nº 1169/2011. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 304/18.
- DIRECTIVA 94/62/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO relativa a embalagens e resíduos de embalagens. (20 de Dezembro de 1994). *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.
- eurostat -Statistics Explained. (21 de Dezembro de 2016). Obtido de Agriculture, forestry and fishery statistics - 4: Milk and milk product statistics: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk_and_milk_product_statistics
- García , F., Cardona, L., & Garcés, Y. (1 de Janeiro de 2008). Estimación de la vida útil fisicoquímica, sensorial e instrumental de queso crema bajo en calorías. *REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN*, 5, 28-33. Obtido em 25 de Maio de 2017

- Gebretensay, A., Pal, M., Shiberu, T., Abdurahman, M., & Karanfil, O. (January de 2015). The Role of Bacteriosin as Food Preservative. *BEVERAGE & FOOD WORLD*, 42, pp. 28-35.
- Ho, T. M., Howes, T., & Bhandari, B. R. (August de 2016). Methods to extend the shelf-life of cottage cheese – a review. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 313-327.
- Instituto Nacional de Estatística, I. (22 de Julho de 2014). *Estatísticas Agrícolas 2013*. Obtido de Instituto Nacional de Estatística, I.P.
- Instituto Nacional de Estatística, I. (Ed.). (2016). *Estatísticas Agrícolas 2015*. Obtido de INE.
- Instituto Nacional de Estatística, I. (2017). *Estatísticas Agrícolas 2016*. Obtido de INE.
- Instituto Nacional de Estatística, I. P. (Ed.). (2015). *Estatísticas da Produção e Consumo de Leite 2015*. Obtido de INE.
- João Noronha, J. a. (2005). *Escola Superior Agrária de Coimbra*. Obtido em 9 de Agosto de 2017, de Boas Práticas de Fabrico em Queijarias Tradicionais: http://www.esac.pt/noronha/CV/livros/Manual%20queijarias_%20final.pdf
- Martín, V. (2016). *Efecto del tratamiento de altas presiones hidrostáticas y del almacenamiento sobre la seguridad y la calidad nutricional, sensorial y funcional de smoothies como alternativa a las bebidas mixtas comerciales*. Madrid: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID - FACULTAD DE FARMACIA.
- OMS, & FAO. (2009). *Producción de alimentos de origen animal*. (C. Alimentarius, Ed.) Obtido de FAO.
- OMS, & FAO. (2011). *Leche y Productos Lácteos*. Obtido de FAO.
- Publications, I. (Ed.). (2013). *Bulletin of the IDF No. 470*. Obtido de International Dairy Federation : <https://store.fil-idf.org/product/the-world-dairy-situation-2013-2/>
- Roldão, M. (2014). *ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS NA CONSERVAÇÃO DE SUMO DE MAÇÃ 100%*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia - Universidade de Lisboa.
- Vieira, A. (2011). *Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de Listeria monocytogenes em queijo Minas Frescal processado pelo método de acidificação direta*. Piracicaba: Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

WILBEY, R. (May de 1997). Estimating shelf-life. *International Journal of Dairy Technology*, 50. Obtido em 30 de Maio de 2017

7. ANEXOS

7.1. Anexo I – Ficha Técnica de Protective

PROTECTIVE

DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES

Se trata de un extracto natural protector procedente de pequeños péptidos inhibidores. Se caracteriza por frenar el crecimiento de microorganismos indeseables, sin inhibir el crecimiento de las bacterias lácticas. Por lo tanto, no interfiere en el proceso natural de maduración del queso. No contiene antibióticos. Ayuda a evitar la contaminación por *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Aumenta el rendimiento de la leche entre el 1 y 2 %. Alarga la vida útil de los productos frescos de consumo rápido.

MODO DE EMPLEO Y DOSIFICACIÓN

Se aconseja adicionar PROTECTIVE lo antes posible después del ordeño o recogida de la leche, en el tanque de refrigeración.
La dosis recomendada es 250 mL por cada 1000 L de leche.

ALMACENAMIENTO

Se recomienda almacenar PROTECTIVE en ambiente frío ($4-8^{\circ}\text{C}\pm 1$) y seco (H. R. < 50%). En estas condiciones el producto mantiene sus propiedades durante 8 meses. No se requiere transporte en frío.

PRESENTACIÓN

Se presenta en envases unitarios de polietileno de alta densidad de 1, 5 y 25 Kg con tapón de rosca y precinto de seguridad.



CERTIFICADO NO OMG

PROTECTIVE se produce con materias primas e ingredientes exentos de Organismos Genéticamente Modificados conforme a los reglamentos europeos CE 1829/2003 y 1830/2003

FICHA TÉCNICA
 Fecha Revisión Enero 2017
 Pág.2/2

PROTECTIVE

ALERGENOS

CONTROL MICROBIOLÓGICO

ALERGENO	SI	NO	La especificaciones de control microbiológico son:	
Cereales con gluten		X		
Crustáceos		X		
Huevos		X		
Pescado		X		
Cacahuetes		X		
Soja	X	X		
Leche y productos lácteos (lactosa)				
Frutos de cáscara		X		
Apio		X		
Mostaza		X		
Semillas de sésamo		X		
Dióxido de azufre y sulfitos		X		
Altramuces		X		
Moluscos		X		
			Aerobios mesófilos	<1000 ufc/mL
			Enterobacterias totales	<10 ufc/mL
			Coliformes	<10 ufc/mL
			Levaduras	<10 ufc/mL
			Mohos	<10 ufc/mL
			Staphylococos coagulasa positiva	<10 ufc/mL
			Salmonella spp.	Ausencia
			Listeria monocytogenes	Ausencia

INFORMACIÓN ADICIONAL

CERTIFICACIÓN ISO 9001



7.2. Anexo II – Análise sensorial

Análise Sensorial

Queijo Fresco

- 1) Responda de 1 a 5, sendo 1 péssimo e 5 ótimo, às seguintes questões.

- Relativamente à amostra **A**:

Questão	Classificação
Sabor	
Textura	
Aspecto	

Comentários:

- Relativamente à amostra **B**:

Questão	Classificação
Sabor	
Textura	
Aspecto	

Comentários:

Relativamente à amostra **C**:

Questão	Classificação
Sabor	
Textura	
Aspecto	

Comentários:

- 2) Qual foi a amostra que preferiu:
- 3) Considera vantajoso o aumento do prazo de validade?
Sim ____ Não ____
- 4) Deixaria de comprar o queijo fresco se este começasse a ter aditivos?
Sim ____ Não ____
- 5) Sugestões:

Muito Obrigado

7.3. Anexo III – Resultados Análise Sensorial no 2º dia

Tabela 14 - Resultados de Análise Sensorial ao 2º dia do 1º fabrico (06/04/2017)

Amostra: controlo			Amostra: Adição ao leite			Amostra: Adição à coalhada			Amostra preferida	Preferida
Sabor	Textura	Aspeto	Sabor	Textura	Aspeto	Sabor	Textura	Aspeto		
4	4	4	3	4	5	4	3	4	Controlo	Adição ao leite
3	4	4	4	4	3	3	4	4	Adição ao leite	
4	4	4	4	5	5	3	3	4	Adição ao leite	
4	4	4	5	5	5	5	5	5	Adição ao leite	
5	5	5	5	5	5	4	4	4	Adição ao leite	
2	2	5	5	5	5	3	3	5	Adição ao leite	
4	4	5	5	4	5	3	5	4	Adição ao leite	
5	4	4	4	5	5	3	3	4	Adição ao leite	
5	5	5	4	4	3	2	2	2	Controlo	
3	3	4	2	3	3	4	4	5	Adição à coalhada	
4	4	4	3	4	4	3	2	4	Controlo	

Tabela 15 - Resultados de Análise sensorial no 2º dia do 2º fabrico (07/04/2017)

Amostra: controlo			Amostra: Adição ao leite			Amostra: Adição à coalhada			Amostra preferida	Preferida
Sabor	Textura	Aspeto	Sabor	Textura	Aspeto	Sabor	Textura	Aspeto		
3	3	4	5	5	5	4	4	4	Adição ao leite	Adição ao leite
3	4	4	4	5	5	5	5	5	Adição à coalhada	
4	4	4	5	5	5	4	4	4	Adição ao leite	
3	4	4	5	5	4	5	4	5	Adição ao leite	
4	4	4	5	5	4	5	4	5	Adição ao leite	
3	3	3	4	4	4	4	4	4	Adição ao leite	
4	3	4	5	5	5	4	4	4	Adição ao leite	
2	2	2	4	4	4	3	3	3	Adição à coalhada	
2	2	5	4	4	4	5	5	5	Adição à coalhada	

7.4. Anexo IV – Resultados Análise sensorial no 6º dia

Tabela 16 - Resultados de Análise Sensorial ao 6º dia do 1º fabrico
(11/04/2017)

Amostra: controlo			Amostra: Adição ao leite			Amostra: Adição à coalhada			Amostra preferida	Preferida
Sabor	Textura	Aspeto	Sabor	Textura	Aspeto	Sabor	Textura	Aspeto		
4	4	4	3	3	3	3	3	3	Controlo	Adição ao leite
4	4	5	5	5	5	4	4	5	Adição ao leite	
3	4	4	5	5	4	4	4	5	Adição ao leite	
3	4	4	5	4	4	4	4	4	Adição ao leite	
4	4	4	5	5	5	3	3	3	Adição ao leite	
3	2	4	4	5	5	3	2	4	Adição ao leite	
2	2	2	5	5	5	3	3	3	Adição ao leite	
3	5	5	5	5	5	5	5	5	Adição ao leite	
4	5	5	5	5	5	3	5	5	Adição ao leite	

Tabela 17 - Resultados de Análise Sensorial ao 6º dia do 2º fabrico
(12/04/2017)

Amostra: controlo			Amostra: Adição ao leite			Amostra: Adição à coalhada			Amostra preferida	Preferida
Sabor	Textura	Aspeto	Sabor	Textura	Aspeto	Sabor	Textura	Aspeto		
3	3	4	5	5	5	4	4	4	Adição ao leite	Adição ao leite
3	4	4	5	5	5	5	5	5	Adição ao leite	
4	4	4	3	3	3	4	4	4	Adição ao leite	
3	4	4	5	5	4	5	4	5	Adição ao leite	
4	4	4	5	5	4	5	4	5	Adição ao leite	
1	1	1	5	5	5	4	4	4	Adição ao leite	
4	3	4	5	5	5	4	4	4	Adição ao leite	
1	1	1	2	2	2	3	3	3	Adição à coalhada	
2	2	2	4	4	4	5	5	5	Adição à coalhada	

7.5 -. Anexo V – Resultados Análise sensorial no 2º e 6º dias

Tabela 18 - - Resultados de Análise Sensorial ao 2º dia
(13/07/2017)

Amostra: controle			Amostra: Dose recomendada			Amostra: DR +25%			Amostra: DR +50%			Amostra Preferida	Preferida
Sabor	Textura	Aspetto	Sabor	Textura	Aspetto	Sabor	Textura	Aspetto	Sabor	Textura	Aspetto		
4	4	4	5	5	5	5	5	5	4	4	4	DR+25%	Controlo
3	3	3	4	4	4	3	3	3	4	4	4	DR+25%	
5	5	5	5	3	2	5	4	5	4	4	4	Controlo	
3	3	4	4	4	3	5	4	4	5	4	4	DR+25%	
3	3	3	4	3	3	5	4	4	5	4	4	DR+25%	
4	4	4	2	2	2	4	4	3	5	5	5	DR+50%	
4	4	4	5	5	5	1	1	1	3	3	3	DOSE RECOMENDADA	
4	4	4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	Controlo	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	2	Controlo	
5	5	5	3	3	3	3	3	3	4	4	4	Controlo	

Tabela 19 - Resultados de Análise Sensorial ao 6º dia (17/07/2017)

Amostra: controle			Amostra: Dose recomendada			Amostra: DR +25%			Amostra: DR +50%			Amostra preferida	Preferida
Sabor	Textura	Aspetto	Sabor	Textura	Aspetto	Sabor	Textura	Aspetto	Sabor	Textura	Aspetto		
4	5	5	3	5	5	4	5	5	5	5	5	DN+50%	Dose Recomendada
5	5	5	5	5	5	4	4	4	5	5	5	DOSE RECOMENDADA	
4	4	5	5	5	5	4	4	5	4	5	5	DOSE RECOMENDADA	
2	1	2	4	5	4	4	4	4	4	3	3	DOSE RECOMENDADA	
3	3	3	3	3	3	5	5	5	4	4	4	DN+25%	
3	3	3	5	5	5	4	5	5	4	4	5	DOSE RECOMENDADA	
4	4	4	3	3	3	5	5	5	4	4	4	DN+25%	
4	4	4	4	4	4	2	2	2	4	4	4	DOSE RECOMENDADA	
4	5	5	3	3	5	3	3	3	5	5	5	DN+50%	
3	3	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5	DN+50%	